

Aus dem Robert Koch—Institut, Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Prof. Dr. med. Hansjürgen Raettig

Orale Immunisierung von Zwerg-
schweinen mit Hammelerythrozyten und
die Primärantwort immunkompetenter
Zellen in Darm, Milz und Lymphknoten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Abel
aus Berlin

1974

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
Direktor: Prof. Dr.med. Hansjürgen Raettig

Orale Immunisierung von Zwergschweinen mit Hammelerythrozyten und die Primärantwort immunkompetenter Zellen in Darm, Milz und Lymphknoten

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wolfgang Abel
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Professor Dr. med. Hilde Götz



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20. August 1974

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
EINLEITUNG	7
Aufgabenstellung	16
MATERIAL UND METHODIK	17
Versuchstiere	17
Immunisierung	17
Nachweis immunkompetenter Zellen	18
Versuchsansatz	19
Versuchsanordnung	20
Versuchstiergruppen und Immunisierungsschema	21
ERGEBNISSE	22
DISKUSSION	28
ZUSAMMENFASSUNG	36
LITERATURANGABEN	37

meiner Mutter gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Einleitung

Die Möglichkeit, auf oralem Weg die Abwehrfähigkeit eines Organismus gegen Fremdartigen positiv zu beeinflussen, ist bekannt, seit EHRLICH 1891 von Mäusen berichtete, die er durch Verfütterung steigender Mengen toxischer Eiweiße immun gemacht hatte gegenüber nachfolgenden Dosen, die auf unbehandelte Mäuse tödlich wirkten (36). Auch die Ansicht, daß eine lokale, das heißt, orale Immunisierung in vielen Fällen "in praxi das Beste und Sicherste wäre" (134), weil sie den natürlichen Infektionsweg nachahmen würde, ist schon 1905 von WASSERMANN (134) vertreten worden. Die praktische Anwendbarkeit ist dann auch für Menschen und Tiere in etlichen Versuchen erwiesen (98,100,113,121).

Für die enterale Immunisierung besteht jedoch viel mehr als für die parenterale das Problem nachzuweisen, ob in ausreichendem Maß und auf welche Weise eine Immunabwehr in Gang gesetzt wird.

Obwohl Analogschlüsse aus Untersuchungen einer Spezies auf die andere a priori nicht gezogen werden dürfen, habe ich mir zur Aufgabe gestellt, Aufschlüsse über Art und Kinetik der immunologischen Primärantwort an einem Tier zu erhalten, das in seiner Phylogenese und seinen physiologischen Reaktionen dem Menschen besonders nahesteht (21,50).

Bereits am Anfang stellten sich Forscher der oralen Immunisierung dem Problem, ob diese zu einem lokal begrenzten oder zu einem allgemeinen Schutz führt. Zu letzterer Ansicht kamen schon früh unter anderen BAILEY (5), POWELL (94) und WEBSTER (135). Angeregt durch die Arbeit FORSSMANN'S (42) über die Erzeugung eines Antikörpers durch Antigene verschiedener Herkunft, gelang es ihnen, auf enteralem Weg, oral bzw. nasal, nach Gaben roter Blutkörperchen im Serum ihrer Versuchstiere, Hämolysine gegen die fremden Erythrozyten nachzuweisen (5,94). WEBSTER (135) erbrachte mit dem

Schutz seiner Tiere sowohl gegenüber einer oralen als auch einer intraperitonealen Infektion von Typhusbakterien, folgend auf eine entsprechende orale Immunisierung, einen Nachweis, daß die so erworbene Abwehr allgemeiner Art war. Diese Ansicht wurde von LOEFFLER (71) nicht vertreten. Auch er hatte Mäuse oral mit abgetöteten *S. typhi murium* Bakterien belastet. Doch seine Tiere überstanden die nachfolgende enterale Infektion mit virulenten Erregern nur dann, wenn sie zuvor auch enteral, nicht wenn sie parenteral immunisiert waren. Unter anderem zog er daraus den Schluß, daß die orale Immunisierung zu einer begrenzten Organimmunität führt und vermutete dabei den Einfluß zellulärer Elemente der Darmwand (71).

Speziell mit dieser Funktion des Darmes setzte sich BESREDKA (7,8) auseinander: Infolge einer oralen Erstimmunisierung kommt es seiner Meinung nach zu einer vorübergehenden Läsion der intestinalen Mukosa, dadurch gelangt antigenes Material in das strömende Blut und löst so eine meßbare Antikörperantwort aus. Auf eine Zweitimmunisierung erhielt BESREDKA trotz bleibender Immunität keinen neuen Antikörperanstieg. Er glaubte deshalb, daß die Darmwand jetzt einen Zustand der Impermeabilität für die Noxe erlangt hat (8). Eine Boosterreaktion als Beweis eines immunologischen Gedächtnisses und damit des theoretischen Impferfolges konnte er nicht aufzeigen. Er lehnte sogar den Antikörpertiter als Kriterium des Impferfolges ab (8). Jedoch gelang es ihm nicht, seine Hypothese der immunologischen Barriere der Darmwand auf andere Weise zu objektivieren. Offen blieb auch, ob die Vollantigene wegen ihrer Molekülgröße überhaupt resorbiert werden, und ob sie aufgrund ihrer biochemischen Struktur nicht vorher enzymatisch gespalten werden und damit ihre Antigenität verlieren. Der zweifelsfreie Nachweis, daß sich in der Darmwand ein immunologisches Geschehen abspielen kann, ließ sich damals nicht führen, und die orale Immunisierung geriet wegen dieser mangelnden Objektivierbarkeit der parenteralen gegenüber ins Hintertreffen.

Neue Impulse brachten erst die Ergebnisse BURROWS (16,17), der in den Fäzes spezifische Antikörper gegen die Erreger fand. Diese Antikörper ließen sich früher erfassen als gleich spezifische Antikörper im Serum der Versuchsobjekte, sie verschwanden auch eher als die zweiten (16). BURROWS folgerte, daß diese "Kopro-Antikörper", wie er sie nannte, unabhängig vom Serum und möglicherweise lokal entstanden sind (17). Auf jeden Fall ist der Darm in Immunitätsvorgänge einbezogen. Daneben muß es möglich sein, daß antigenes Material ohne Verlust seiner Antigenität und unbeschadet seiner Größe in die Darmwand gelangt. Für darmpathogene Keime war eine Erklärung durch die entstehenden Läsionen nicht schwierig (7,8,16). Aber auch für nichtpathogene Eiweiße gelang schon früh über die Induzierung spezifischer Antikörper der indirekte Nachweis, daß sie die Darmwand unbeschädigt passiert haben mußten (17,94,127,133). Diese Annahme wurde später durch die Beobachtung gestärkt, daß am Ende des Dünndarms noch zehn Prozent von aufgenommenen Nahrungsproteinen unverändert vorliegen (12).

VOLKHEIMER konnte mit verschiedenen Partikeln definierter Größe zeigen, daß der Darm imstande ist, korpuskuläre Elemente bis zu einer Größe von $95\text{ }\mu$ aufzunehmen, von wo aus sie in das periphere Blut weitergeleitet werden (130,131,132). Dieser Vorgang geschieht parazellulär, und er nannte ihn im Gegensatz zur Resorption, die sich im Ängströmbereich abspielt, Persorption.

Andere Untersucher stellten mit Bakterien (111), Bakteriophagen (95) und Viren (96) eine Kinetik dieses Persorptionsmechanismus auf, die sich als unabhängig von der Größe oder der Pathogenität des Keimes erwies. Der Einwand, daß Persorption nur mit biologisch indifferenten oder gegen Verdauung geschützten Korpuskeln stattfindet, wurde unter anderem durch eine Arbeit von LONG (72) entkräftet: Er verfütterte fluoresceinmarkiertes Protein an junge Schweine und wies darauf diese Partikel im Darm histologisch unter dem Fluoreszenz-

mikroskop in den intestinalen Mukosazellen bis hin zum proximalen Kolon nach; sie waren von der Basalmembran in das portale und chylöse Kapillargebiet geströmt. Der doppelte Persorptionsweg über venöse und Lymphgefäße wurde auch von VOLKHEIMER (132) bewiesen.

Insbesondere RAETTIG ist es zu verdanken, durch systematische Erforschung vieler Einzelprobleme die orale Immunisierung fundiert zu haben (99). Zum Beispiel führte er an Kleintieren den statistisch gesicherten Nachweis der Senkung der Endmortalität um 50 % nach oraler Impfung gegenüber seinen nichtgeimpften Kontrolltieren (97). Diese Feststellung wurde auch von anderer Seite gemacht (77) und ließ sich ebenso bei Großvieh wiederholen (101, 121).

Nachdem gesichert war, daß unter normalen Umständen hochmolekulare Proteine und Polysaccharide die Darmwand ohne Verletzung ihrer Struktur passieren können, wurde eine Theorie über die Entstehung der natürlichen Blutgruppen-Antikörper plausibel. Danach sollen diese durch exogenes Material entstehen, das auf enteralem Weg in den Organismus gelangt (34,66,119,139). Als induzierendes Antigen können zahlreiche Parasiten und Bakterien angesehen werden, die Antigengemeinschaften mit organismusfremden Blutgruppen haben (139), speziell Keime der physiologischen Darmflora, und hier besonders *E. coli* weisen gemeinsame Antigendeterminanten auf (66,119). Für den Säugling beträgt die Wahrscheinlichkeit der Abhängigkeit der Isoantikörper von der Stuhlflora 90 - 95 % (66). Weiter wird glaubhaft, daß auch die stille Feiung als Produkt einer unbemerkt abgelaufenen oralen Immunisierung angesehen werden kann.

So wie korpuskuläre Teilchen vom Darmlumen in das Kapillargebiet im Sinne der Persorption einwandern, wird auch der umgekehrte Weg, aus dem Blut in das Intestinallumen beschritten: Es wandert zum Beispiel ein großer Teil der lymphoiden Zellen, nachdem er den intravasalen Raum verlassen

hat, zur Mukosa des Darmes und läßt sich im Lumen nachweisen (15,49). Gleiches geschieht mit intravenös applizierten Phagen (111). Auch Immunglobuline passiv gegeben (17, 112) oder aktiv entstanden (29,112,138), werden in den Darm transportiert.

Daraus erhebt sich die Frage nach der Eigenständigkeit der Koproantikörper und damit nach der Immunkompetenz des Darmes; ist dieses Organ ein Produzent oder nur eine Durchgangsstation für Immunglobuline bzw. Immunzellen? Als Argument für eine ortsständige Produktion wurde zunächst die eigene Kinetik angeführt. Nach oraler Belastung kommt es zu einem schnelleren Anstieg der Immunglobulin-Titerkurve im Darmsekret und auch zu einem rascheren Abfall als im Serum (16, 17,67,68,103). Als zweites wurde nach enteraler Impfung ein höherer Kopro-Antikörpertiter als nach parenteraler in den Fäzes gefunden (44,67). Das Verteilungsmuster der Immunglobuline ist schließlich in lokalen Sekreten ein anderes als das im Serum.

Die antikörperbedingte Immunität speziell der Mammalia besteht allgemein in den fünf Globulinklassen Gamma-A, -D, -E, -G und -M mit ihren Unterklassen (102,120), wobei im Serum Gamma -G und -M führend sind. Doch auch außerhalb des Serums ließen sich in letzter Zeit Antikörper nachweisen: Das Colostrum ist als antikörperhaltiges Sekret bekannt, wobei anteilmäßig IgA dominiert (23,24,104,124). Im Respirationsstrakt wurden Immunkörper gegen Bakterien und Viren wiederum hauptsächlich der Klasse A dargestellt (79,107,116, 125), im Verdauungskanal ließen sich von der Mundhöhle, hier speziell den Speicheldrüsen, bis zum Rektum Immunglobuline darstellen, bei Menschen (46,56,124) ebenso wie bei etlichen Tieren (24,28,68,112,122,129). Das starke Vorkommen von IgA in den lokalen Flüssigkeiten gegenüber nur Spuren von IgG und IgM wurde auch hier bestätigt.

Andererseits berichteten viele Autoren über ein lokales Vorherrschen von M-Immunglobulinen im Falle einer mangelnden oder ausbleibenden IgA-Bildung (14,52,124).

Das Auffinden von antikörperproduzierenden Zellen bewies letztlich, daß der Darm aktiv am immunologischen Geschehen teilnimmt. Von vielen Autoren wurden die Zellen, die in Milz und Lymphknoten Immunglobuline bilden, als kleine und große Lymphozyten, Plasmoblasten, Plasmozyten und zum geringen Teil als Retikulumzellen und Makrophagen erkannt (4,13,9, 20,75,85,13). Durch Verpflanzung von Suspensionen intestinaler Zellen eines zuvor oral belasteten Tieres ließ sich mittels spezifisch auftretender Passiv-Cutaner-Anaphylaxie indirekt zeigen, daß eine Induktion lokal im Darm vorkommender immunkompetenter Zellen stattgefunden haben mußte (70,108). Weil das Produkt dieser Zellen weder agglutinierenden noch präzipitierenden Charakter besaß, wurde es als "Reagin" beschrieben (108). Ein anderer indirekter Hinweis auf die Zellen, die hauptsächlich in die Immunantwort verwickelt sind (102,120), war der, daß eben Lymphozyten zahlreich im Darmgewebe nachzuweisen sind (15,49). Insbesondere für Schweine konnte die mit dem Alter zunehmende Besiedlung des Intestinums mit Lymphozyten als Antwort auf eine bakterielle Herausforderung gewertet werden (63).

Die intestinale Gewebeschicht, die das immunologische Interesse besitzt, ist die Lamina propria (2,29,63,137). Doch auch das Epithel der Intima soll ein lymphoides Organ sein; FICHTELIUS (39,40) fand hier bei Säugetieren Lymphozyten, von denen 2 - 3 % in der Lage waren, DNS zu synthetisieren (40), eine Eigenschaft, die Voraussetzung für eine Antikörperproduktion ist. Daneben zog er aus dem geringen Alter einiger Lymphozyten den Schluß auf ihre Entstehung am Orte (40); diese Zellen nannte er zum Unterschied von den aus dem Blut kommenden "Theliolymphozyten" (40). Er setzte den Darm der Säuger in seiner lymphatischen Bedeutung der Bursa Fabricii der Vögel gleich und hielt seine jetzige Entwicklung für eine Vorstufe der Bursa (39,40).

Andere Untersucher bestätigten, daß es unter den Lymphozyten zwei Populationen geben muß, die unterschiedlicher Herkunft sind, und zwar aufgrund der unterschiedlichen Funktionen, die sie besitzen (22,26,102): Die einen Lymphozyten differenzieren sich offenbar im Thymus und wurden daher T-Zellen genannt, die anderen bei Vögeln in der Bursa Fabricii, bei den Mammalia in einem bislang nicht sicher identifizierten Bursaäquivalent und wurden daher B-Zellen genannt.

Ergebnisse von Thymus- respektive bursektomierten Vögeln ließen den Schluß zu, daß den T-Zellen Aufgaben der zellulären Immunität zukommen, während die B-Zellen für die humorale Immunität zuständig sind (26). Analoge Ergebnisse wurden an Patienten gewonnen, die zum einen an einer kongenitalen Agammaglobulinämie litten, keine zirkulierenden Antikörper bilden konnten, aber doch zu Reaktionen zellulär bedingter Immunität fähig waren, zum anderen an kindlichen Patienten mit Thymushypoplasie, die keine zelluläre Immunität aber auf Antigenstimulus humorale Immunität aufwiesen (48).

Zu den direkten Funktionen der T- und B-Zellen gehört die Bindungsfähigkeit für antigenes Material (106). Dazu besitzt die B-Zelle Immunglobuline an der Oberfläche, die als Rezeptoren dienen; sie kann sich teils allein, teils mit Unterstützung der T-Zellen, die deshalb auch als Helferzellen apostrophiert wurden, mit Antigen beladen und wurde deshalb "ABC" = Antigen Binding Cell genannt (102,140). Auf der T-Zelle sind bislang keine globulinartigen Rezeptoren nachgewiesen worden (102). Ein Antigen mit mehreren sich wiederholenden Determinanten haftet ohne Interaktion der Helferzelle, während ein Antigen mit einzigartigen Determinanten mit Hilfe der T-Zellen an die B-Zelle fixiert wird, sich dann bald wieder löst und so frische Rezeptoren auf der B-Zelle enthüllt (38,140). Diese Beobachtung stellt eine Neu belebung der EHRLICHschen Seitenkettentheorie dar.

Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich Immunglobulinen auf der Oberfläche lymphatischer Zellen liegen von weiteren Autoren vor (31,62,74). Diese Antikörper sind außer auf Lymphozyten auch auf Makrophagen und auf Plasmazellen lokalisiert (62). Sie gehören zu den Klassen IgM und IgG (30,74). Die Lymphozyten, die als Antigen bindende Zellen fungieren, ließen sich elektronenmikroskopisch von den übrigen Lymphozyten unterscheiden (62). Ihr Anteil an der Gesamtzahl ist bei nicht-immunisierten Meerschweinchen als gering mit $40/10^5$ Lymphozyten bestimmt worden (30). Erst auf Belastung steigt er signifikant (31); im drainierenden Lymphknoten sollen jetzt $50/10^3$ Lymphozyten imstande sein, das Antigen an den Rezeptoren zu binden (32). Die ABC-Lymphozyten sind zum großen Teil identisch mit immunkompetenten Zellen (33). Nach antigenem Stimulus teilen und differenzieren sich zum Beispiel die kleinen Lymphozyten zum einen in größere Zellen, die auch als Blasten mit ausgeprägten endoplasmatischen Retikulum gesehen wurden, zum anderen werden einige zu sezernierenden Plasmazellen (33,102). So lassen sich einzelne B-Zellen, aufgrund ihrer Eigenschaft, Hämolysine zu bilden, darstellen (102). Eine weitere Eigentümlichkeit der Differenzierungsprodukte der B-Zelle ist die, im lymphatischen Gewebe zu bleiben und nicht zu zirkulieren (102); hier besteht eine Ähnlichkeit zu den Theliolymphozyten FICHTELIUS' (40).

Plasmazellen, Lymphozyten und retikuloide Zellen konnten mit Methoden, die es erlauben, das Vorkommen von Antikörpern in der einzelnen Zelle zu beurteilen, in der Lamina propria des Darmes als immunkompetent aufgezeigt werden (2, 28,29,46,93,137).

Nun gibt es aber, was das Verteilungsmuster der Immunglobuline aus der Mukosa anbelangt, Ergebnisse, die deutlich gegenüber denen aus dem Sekret differieren. Einige Untersucher kamen zwar in der Schleimhaut wie im Darmsaft zu ähnlichen Ergebnissen, indem sie in beiden Fällen fast ausschließlich

Antikörper des IgA-Typs sahen (28,46,129), andere fanden neben den IgA-Zellen eine beträchtliche Anzahl IgM enthaltender Zellen (2,29,93). Es kehrte sich sogar beim Kalb teilweise (33) und beim jungen Schwein vollständig im ganzen Dünndarmbereich (2) das Verhältnis zugunsten IgM produzierender Zellen um.

Zu den eben erwähnten Methoden gehört besonders die 1963 von JERNE (58) und 1964 von INGRAHAM (57) unabhängig voneinander entwickelte LHG = Lokale Hämolyse in Gel-Technik. Hier wird eine immunkompetente Zelle über die Fähigkeit Hämolyse zu bilden, entdeckt. Zur Hämolyse sind IgM und IgG₂ imstande (11,54,59,84,86).

Die LHG-Technik, die im Original mit Kaninchen (57) bzw. mit Mäusen (58) durchgeführt wurde, wobei das Antigen intravenös appliziert war, ließ sich bei parenteraler Antigenbelastung auch mit anderen Säugetieren (18,109,118), mit Vögeln (117) und mit Amphibien (61) erfolgreich durchführen. Ebenso wurde die aktive Beteiligung lokaler Gewebe wie der Mundschleimhaut und des Darmtraktes an der Immunantwort mit der LHG-Technik bewiesen (122,137). Das Antigen war hierbei direkt intragingival injiziert (122) bzw. mittels Magensonde verfüttert worden (137).

Letztere Befunde, die von WERNER (137) an Mäusen gewonnen wurden, wobei sich die immunologische Primärantwort als eigentümlicher diphasischer Antikörperanstieg am 5. und 18. Tag nach letzter Immunisierung präsentierte, erschienen ermutigend genug, um der Frage nachzugehen, wie die Antwort auf lokale Immunisierung beim Schwein aussieht.

Unter verschiedenen Aspekten hat sich dieses Tier in letzter Zeit als interessantes Versuchsobjekt herausgestellt: Die Epidermis des Schweins ähnelt der des Menschen hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer Reaktionsweise auf physikalische und auch auf bakterielle Noxen (3,25,47,50,115,136). Eine histologische Ähnlichkeit besteht weiter beim Gefäß-

system (43,73), die hier stärker als bei den kleinen Laboratoriumstieren ist. Das Auftreten und der Ablauf der rheumatoiden Arthritis bei Mensch und Schwein weisen beträchtliche Gemeinsamkeiten auf (25,81,115). Vergleichbar ist ferner die Entstehung und Beschaffenheit von Ulcera im Gastro-Intestinaltrakt beider Spezies (53,90). Weitere entsprechende Vorzüge des Schweins gegenüber anderen Laboratoriumstieren sind mehr allgemeiner Natur: die größere gemeinsame Phylogenese, die prinzipielle Ähnlichkeit des Magendarmtraktes als Omnivore, die Domestikation.

Nachteile, die aus erhöhtem Platz- und Futterbedarf entstehen, führten zur Züchtung eines Miniaturschweines. Dieses in Göttingen von HARING und Mitarbeitern (50) gezogene Tier ist anatomisch und physiologisch wohl proportioniert und stellt deshalb keine Kümmerform dar (50). Auch ähnelt die Magen-Darm-Passagezeit der der großen Schweine (60), eine ausreichende Kontaminierung mit antigenem Material bei enteraler Belastung ist also gewährleistet.

Aufgabenstellung

Nach parenteraler Immunisierung ist die Primär- und Sekundärantwort von Milz und Lymphknoten mit der LHG-Technik JERNES (58) und INGRAHAMS (57) hinsichtlich Dauer, Qualität und Quantität unter anderem auch beim Schwein (18,19) beschrieben worden. Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, den oralen Infektionsweg nachzuahmen, weil er in der Natur der häufigste ist und dabei auch die Rolle des zuerst betroffenen Gewebes, der Darmschleimhaut auf Höhe, Art und Kinetik der gebildeten Antikörper während der Primärantwort am Miniaturschwein zu untersuchen.

Material und Methodik

Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an männlichen und weiblichen Göttinger Zwergschweinen (HARING et al. 50) durchgeführt. Die Tiere waren im Wurf aufgewachsen und normal gesäugt. Zu Beginn der Untersuchungen waren sie etwa acht Wochen alt. Zu diesem Zeitpunkt sind Ferkel in der Lage, ausreichend Antikörper zu bilden (105). Während der Immunisierung standen sie abgesondert in besonderen Boxen. Als Futter bekamen sie jetzt Nahrungsabfälle ohne Fleisch (Brot, Kartoffelschalen, Kleie, Milch). Zum Zeitpunkt der Untersuchung betrug ihr Körpergewicht im Durchschnitt 20 kg. Die Schweine wurden mit einem Bolzenschußapparat getötet und dann aus der Vena jugularis entblutet. Nach Öffnung der Bauchhöhle wurden die längliche Milz entnommen und davon eine Probe von 2 cm Länge herausgeschnitten, ferner ein 5 cm langes Segment des proximalen Jenum sowie das dazugehörige Mesenteriallymphknotenpaket. Die Organproben kamen sofort in Flaschen mit gekühltem EAGLES-Medium (35), das mit 10 ml % Trasylol und 5 mg % Kanamycin zur Verhinderung enzymatischer Autolyse oder bakterieller Beeinflussung versehen war. Die Flaschen wurden dann in eine Thermobox gestellt und zum Untersuchungslabor gebracht.

Immunisierung

Wie in der von JERNE (58) angegebenen Weise wurden als Antigen Hammelerythrocyten (SRBC) verwendet. Sie wurden dreimal für je 15 min bei 3000 U/min mit modifiziertem Komplementpuffer (120) gewaschen, danach wurde das Erythrozytensediment wieder 1:5 mit Komplementpuffer aufgefüllt. Diese Suspension wurde bei 4° C aufbewahrt. Sie kam sowohl zur Immunisierung als auch im Antikörnernachweis zur Anwendung.

Nachweis immunkompetenter Zellen

Der Nachweis erfolgte abgewandelt nach der von JERNE (58) und INGRAHAM (57 unabhängig voneinander entwickelten Methode, bei der aus einer Zellsuspension eines immunologisch aktiven Gewebes die einzelnen produzierenden Zellen beurteilt werden können. JERNE hatte in seinem Originalversuch eine Einzeldosis von 4×10^8 Hammelerythrozyten in einer 20 %-igen Suspension intravenös verabreicht (58). Hier erfolgte die Anwendung auf weiter unten beschriebenem oralen und intraperitonealem Weg.

Entnommene Milz und Lymphknoten wurden vom umgebenden Bindegewebe sauber befreit, in frischem, einfach konzentriertem EAGLES-Medium gespült, in kleine Würfel geschnitten und wieder in frisches, einfach konzentriertes EAGLES-Medium überführt. Das Jejunumsegment wurde längs aufgeschnitten und mehrmals in reichlich physiologischer NaCl-Lösung gespült, bis letzte Ingesta beseitigt waren. Dann wurden einzelne Kerkringsche Falten von dem übrigen Darm abgetrennt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Muskularis nicht mitgenommen wurde; histologisch bestehen die Falten aus dem einschichtigen prismatischen Epithel und der für die Versuche interessanten Lamina propria. Die abgetrennten Falten wurden ebenfalls in EAGLES-Medium getan.

Die so vorbereiteten Organstücke wurden jetzt mit einem Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM mit 15 ml Fassungsvermögen 30 sec lang bei 200 U/min homogenisiert. Die Homogenisate wurden grob durch Mullgaze und fein durch ein Stahlgazesieb mit 50 μ Maschenweite gefiltert. Gewebefaserstücke konnten so gut zurückgehalten werden. Die Zellsuspensionen wurden mit einfachem EAGLES-Medium aufgefüllt, so daß ein annähernd gleicher Zellgehalt erreicht wurde. Dann wurden die Proben bis zum Ansatzbeginn in den Kühlschrank gestellt.

Versuchsansatz

Petrischalen waren 1 - 2 Tage zuvor mit einer möglichst blasenfreien Grundschrift aus 1,4 %igem Difco-Agar bedeckt; sie wurden jetzt von Kondenswasser befreit und auf 37° C angewärmt. In ein Wasserbad von 45° C wurden Zentrifugenröhrchen gestellt und aufeinanderfolgend beschickt mit je 1 ml doppelt konzentriertem EAGLES-Medium, 0,1 ml DEAE-Dextran, 1 ml flüssiger, klümpchenfreier 1,4 %iger Difco-Agar, 0,1 ml 20 %ige SRBC-Suspension = 4×10^8 Erythrozyten.

Einige Ansätze wurden zusätzlich nach FINGER (41) modifiziert. Die Grundbeschichtung bestand dabei aus 1,4 %igem Difco-Agar plus 0,5 mg DEAE-Dextran pro ml Agar, der Röhrchenansatz bestand aus 1 ml doppelt konzentriertem EAGLES-Medium, 0,05 ml Modified Barbiturate Buffer (MBB), 1 ml Agarose "Behring", 0,1 ml SRBC 20 %ig in physiologischer NaCl-Lösung.

Jetzt wurde in eine gleichlaufende Serie von drei Röhrchen 0,1 ml Organ-Zellsuspension in EAGLES-Medium pipettiert. Die Röhrchen wurden kurz gequirlt und so schnell auf die Petrischalen ausgegossen, daß dabei keine Luftblasen entstanden. Der Inhalt wurde gleichmäßig über die Grundschrift verteilt und die Schalen bis zum Erstarren des Agars auf eine waagerechte Platte gestellt und anschließend für eine Stunde bei 37° C in einen Wärmeschrank gebracht. Inzwischen wurde mit einer Leukozytenzählkammer nach BÜRKER die Zellzahl jeder Suspension pro ml bestimmt und auf die Gesamtzellzahl umgerechnet, die sich auf der Petrischale befand.

Nach einer Stunde wurde auf jede Schale 1,5 ml 1:10 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünntes Meerschweinchen- bzw. Kaninchenkomplement gegeben, dann wurden die Platten erneut für 30 min in den Wärmeschrank gestellt. Für den Fall, daß im Kulturmedium um sensibilisierte Immunzellen Erythrozyten als Antigen aggregiert waren, bilden sich jetzt hämolytische

Höfe, in deren Mitte eine IgM produzierende Zelle liegt (82, 137). Ein Teil der mit Meerschweinchenkomplement beschichteten Platten wurde danach noch einmal mit Kaninchenkomplement überschichtet, wie es von BUSCHMANN (18) angegeben war und über Nacht bei 37° C inkubiert. Die übrigen kühlten etwa 40 min lang auf Zimmertemperatur ab. Gebildete Plaques waren jetzt zumeist mit dem bloßen Auge erkennbar. Mit dem Stereomikroskop wurden die Platten nun auf Artefakte erythrozytenfreier Zonen abgesucht. Diese waren durch Lichtbreungsverhalten, scharfen Rand der "hämolytischen" Zone oder Fädchen im Zentrum, als ungelöster Agar, Luftblasen oder Staubpartikel zu erkennen. Zur einfacheren Auszählung wurden die Schalen dann mit einer Lösung aus Benzidin, Eisessig und H₂O₂ in aqua dest. übergossen; die farblosen hämolytischen Plaques hoben sich deutlich von der blauen Umgebung ab. Sie wurden mit einem Zählgerät Marke "Boskamp Placont" ausgezählt. Die Plaquezahl wurde mit der Gesamtzellzahl pro Platte auf Plaques pro 10⁶ Zellen umgerechnet.

Versuchsanordnung

Um die immunologische Primärantwort zu verfolgen, wurden 23 Zwergschweine in zwei parenteral und eine oral zu immunisierende Gruppen eingeteilt. Zwei Schweine blieben unbehandelt als Kontrolltiere bei den Gruppen. Die parenterale Immunisierung erfolgte nach lokaler Desinfektion intraperitoneal mit einer 1er Kanüle 1QF paramedian in die Leistenbeuge. Zur oralen Immunisierung wurde den Tieren vor dem Fressen ein Gummikatheter "Rüsch" von 6 mm Ø bis in den Magen geschoben, die Schnauze wurde dabei mit einer Maulsperre offengehalten und der Nacken des Tieres gestreckt, so daß sich der Katheter schnell und ohne Schwierigkeiten einführen ließ. Nachdem das Blut infundiert war, wurde mit reichlich physiologischer NaCl-Lösung nachgespült, um die SRBC gänzlich in den Magen zu bekommen und eine schnelle Magenpassage zu bewirken. Die Tiere vertrugen das Vorgehen reaktionslos, keines der "oralen" Tiere erbrach hinterher das Blut.

Versuchstiergruppen und Immunisierungsschema

1. 5 Tiere je 10 ml 20 %ige SRBC-Suspension = 4×10^{10} Zellen 1 x intraperitoneal
2. 2 Tiere je 20 ml 20 %ige SRBC-Suspension = 8×10^{10} Zellen 1 x intraperitoneal
3. 14 Tiere an 10 aufeinanderfolgenden Tagen je 10 ml 20 %ige SRBC-Suspension oral
4. 2 Tiere, die zu 1 und 3 kamen, nicht behandelt wurden und als Kontrolltiere dienten.

Die Tiere der Gruppe 1 wurden am 5., 7., 10., 12. und 20. Tag nach der Immunisierung getötet. Die Tiere der Gruppe 2 wurden am 7. und 10. Tag danach getötet. Die Tiere der Gruppe 3 wurden am 5., 6., 7., 8., 9., 10., 16., 18., 19., 20., 21., 22. und 24. Tag nach der letzten oralen Immunisierung getötet, der Versuch vom 8. Tag danach wurde wiederholt.

Von den Organen eines jeden Tieres wurden je drei gleichlaufende Ansätze gemacht. Um den Einfluß des Komplements auf die Plaquebildung zu studieren, wurden bei den ersten drei Tieren der Gruppe 1 neben je drei Ansätzen pro Organ mit Meerschweinchenkomplement je drei mit Kaninchenkomplement und je drei mit der Kombination Meerschweinchen- plus Kaninchenkomplement durchgeführt. Um den Einfluß des Agars auf die Plaquebildung zu untersuchen, wurden die Ansätze der Tiere der Gruppe 3 vom 19. und 21. Tag neben der oben beschriebenen Weise nach der von FINGER (41) angegebenen Methode durchgeführt. Bei allen Ansätzen liefen Leerproben mit, denen unterschiedlich eine Komponente fehlte, um Artefakte zu erkennen. Die Ergebnisse, die sich auf Plaques pro 10^6 Gesamtzellen beziehen, wurden aus dem arithmetischen Mittelwert der Resultate der drei Petrischalen pro Suspension berechnet.

Ergebnisse

In der Gruppe 1 zeigte sich am fünften Tag nach der Immunisierung mit 21 Plaques pro 10^6 Gesamtzellen in der Milz bereits eine positive Antwort auf das Antigen, während Lymphknoten und Darm noch nicht reagiert hatten. Die Milz steigerte sich zum siebenten Tag weiter auf 59 Plaques pro 10^6 , jetzt lag auch allgemein ein deutlich positives Ergebnis des Darmes mit 25 Plaques und der Lymphknoten mit 10 Plaques pro 10^6 vor. Am 10. Tag waren die antikörperproduzierenden Zellen im Darm auf 3 und in den Lymphknoten auf 2 Plaques bereits zu Backgroundwerten abgefallen; die Milz reagierte noch positiv, aber rückläufig mit 25 Plaques. Am 12. Tag schien die Primärantwort schließlich abgeschlossen, aus Jejunum und Lymphknoten waren keine plaquebildenden Zellen mehr zu gewinnen, aus der Milz mit 3 Plaques ebenfalls nur ein Backgroundwert. Die Immunantwort des 20. Tages nach der Belastung fiel weiter negativ aus, in der Milz ließen sich 3, im Darm 4 Plaques nachweisen; das Ergebnis für die Lymphknoten war allerdings mit 8 Plaques leicht überhöht.

Diese Ergebnisse waren unter Zusatz von Meerschweinchenkomplement zum Ansatz gewonnen. Vom 5., 7. und 10. Tag wurden von den Organen derselben Tiere daneben Ansätze mit Kaninchenkomplement und Ansätze mit der Kombination beider Komplemente gefertigt. In der Gruppe 1 b brachte der fünfte Tag hier eine positive Milzantwort mit 15 Plaques - die Milz lag damit wiederum an erster Stelle - sowie mit 6 Plaques im Darm und 1 Plaque aus den Lymphknoten unauffällige Werte dieser Organe. Auch am siebenten Tag war bei den letzteren kein Ansteigen zu verzeichnen, die Milz reagierte jedoch mit 24 Plaques stärker als am fünften Tag. Die Ergebnisse des 10. Tages lagen wiederum im Normalbereich.

Im Vergleich der Komplemente zeigte das vom Meerschweinchen eine offensichtlich höhere Wirksamkeit, deshalb wurde in allen folgenden Versuchen nur noch Meerschweinchen-Komplement benutzt.

Gruppe 1 a

Komplement im Ansatz: Meerschweinchen C'

Immunisierungsart: i.p.

Immunisierungsmenge: $1 \times 10 \text{ ml} = 4 \times 10^{10}$ SRBC

Tage nach letzter Immunisierung	Darm	Plaques pro 1 Million Gesamtzellen in	
		Lymph- knoten	Milz
5	7	1	21
7	25	10	59
10	3	2	25
12	0	0	3
20	4	8	3
Kontrolltier	3	1	4

Gruppe 1 b

Komplement im Ansatz: Kaninchen C'

Immunisierungsart: wie bei Gruppe 1 a

Immunisierungsmenge:

Tage nach letzter Immunisierung	Darm	Plaques pro 1 Million Gesamtzellen in	
		Lymph- knoten	Milz
5	6	1	15
7	3	2	24
10	1	2	nicht gewertet

Die Versuche mit dem Zusatz beider Komplemente, wie von BUSCHMANN (18) angegeben, konnten nicht ausgewertet werden. Die Erythrozytensuspension war, nachdem die Petrischalen über Nacht im Inkubator gestanden hatten, am nächsten Morgen vollständig hämolysiert. Durch Heraufdiffundieren von Wasser aus der Grundbeschichtung in die Oberschicht kam es hier wahrscheinlich während des relativ langen Zeitraums zu einem extra-intraerythrozytären osmotischen Gefälle, das infolge der Wasseraufnahme die Erythrozytenmembran zum Platzen gebracht hatte.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob bei einer Erhöhung der parenteral gegebenen Antigenmenge, eine stärkere Primärantwort erwartet werden konnte. Die Tiere der Gruppe 2 bekamen daher die doppelte Dosis der Tiere der Gruppe 1 intraperitoneal gespritzt. Die Tabelle zeigt am 7. Tag danach ein Ergebnis, das in seiner Höhe und Verteilungsart nicht erwartet war. Die Mesenteriallymphknoten antworteten mit 932 immunkompetenten Zellen pro 10^6 Gesamtzellen mit Abstand am stärksten vor dem Darm mit 242 PFC pro 10^6 , die Milz kam mit 11 Plaques kaum aus dem Background heraus. Aus den Organen des Schweines, das am 10. Tag danach getötet wurde, waren in allen Fällen lediglich Hintergrundwerte ermittelt worden. Ich komme darauf noch zurück.

Die Tabelle der Gruppe 3 gibt die Übersicht über die Ergebnisse der oralen Immunisierung nach zehnmaliger Gabe. Die Versuchsreihe ging über 24 Tage nach letzter Sondengabe. Dies geschah, um einem Phänomen bezüglich der Kinetik der Primärantwort nach SRBC-Gabe bei Mäusen nachzugehen; WERNER (137) hatte folgend auf orale wie auf intraperitoneale Belastung nach einem ersten Maximum der plaquebildenden Zellen um den fünften Tag einen zweiten Gipfel am 18./19. Tag erhalten.

Die Primärantwort bei Schweinen war anhand spezifischer Immunzellen bereits am 5. Tag nach der letzten Immunisierung

Gruppe 2

Immunisierungsart: i. p.

Immunisierungsmenge: $1 \times 20 \text{ ml} = 8 \times 10^{10}$ SRBC

Tage nach letzter Immunisierung	Plaques pro 1 Million Gesamtzellen in		
	Darm	Lymph- knoten	Milz
7	242	939	11
10	0	1	3

Gruppe 3

(Vergleichende Ansätze mit der von FINGER angegebenen Methode: Oberschicht ohne DEAE-Dextran, gekennzeichnet als "ohne", i.G. zur anderen = "mit")

Immunisierungsart: oral

Immunisierungsmenge: $10 \times 10 \text{ ml} = 4 \times 10^{11}$ SRBC

Tage nach letzter Immunisierung	Plaques pro 1 Million Gesamtzellen in					
	Darm		Lymph- knoten		Milz	
	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
19	1	2	1	0	1	1
21	0	6	1	1	3	3

im Darm mit 17 Plaques, gefolgt von der Milz mit 13 Plaques, voll nachweisbar. Am 6. Tag hatten alle untersuchten Organe geantwortet. An der Spitze lag wiederum das Jejunum, gesteigert auf 32 Plaques, gefolgt von Lymphknoten mit 11 und Milz mit 12 Plaques. Wie die späteren Ergebnisse zeigen, sind diese Zahlen zwar niedrig, jedoch deutlich von unspezifischen folgenden Werten zu unterscheiden. Am 7. Tag sind die Plaquezahlen insgesamt zum Background abgefallen, am 8. Tag desgleichen; auch in einer Wiederholung des 8. Tages zeigte sich kein anderes Resultat. Der 9. Tag brachte einen Anstieg der Immunzellen im Darm auf $40 \text{ pro } 10^6$, Lymphknoten und Milz reagierten aber nicht mit. Im weiteren zeigten sich bis zum 24. Tag in keinem Organ plaquebildende Zellen, die den natürlichen Hintergrund überzufällig überragten.

Eine Orientierung über die Höhe des unspezifischen Backgrounds ist anhand der Werte der Kontrolltiere gegeben. Sie liegen in Darm und Milz höher als in den Lymphknoten.

Da FINGER (41) die Möglichkeit einer unterschiedlich hohen Plaqueausbildung bei Verwendung verschiedener Agarsorten im Versuchsansatz gefunden hatte, wurden vom 19. und 21. Tag der oralen Versuchsreihe vergleichsweise Ansätze mit denselben Zellsuspensionen, aber modifizierten restlichen Komponenten gefertigt. Auch mit der nach FINGER (41) vorgenommenen Methode war an beiden Tagen kein zweiter Anstieg der Primärantwort über den Background hinaus erkennbar.

Gruppe 3

Immunisierungsart: oral

Immunisierungsmenge: $10 \times 10 \text{ ml} = 4 \times 10^{11}$ SRBC

Tage nach letzter Immunisierung	Plaques pro 1 Million Gesamtzellen in		
	Darm	Lymph- knoten	Milz

5	17	4	13
6	32	11	12
7	4	2	2
8	5	2	3
9	40	1	3
10	1	0	1
16	4	3	3
18	6	1	2
19	2	0	1
20	7	2	2
21	6	1	3
22	6	4	3
24	3	1	2

Kontrolltier	3	1	4
--------------	---	---	---

Diskussion

Zunächst zeigen meine Ergebnisse nach parenteraler Belastung eine gute Übereinstimmung mit denen BUSCHMANN'S (18,19), die ebenfalls an Schweinen gewonnen wurden. Dies gilt sowohl für die stärkste Antwort seitens der Milz als auch für die Kinetik mit der höchsten PFC-Zahl am 7. Tag nach der Antigenzufuhr.

Im Gegensatz zu BUSCHMANN (18,19), der erst nach zweimaliger Komplementzugabe hämolytische Höfe durch PFC sah, konnte ich bereits nach einmaliger Zugabe deutliche Höfe erkennen. Die Erklärung scheint in der bekannten antikomplementären Eigenschaft des Agars (41,58) zu liegen. Der Agar bindet das erste Komplement esterartig mit seinen Sulfonsäuregruppen und verhindert so dessen Wirksamkeit. Erst das zweite Komplement wird, wenn diese Bindungsstellen dann abgesättigt sind, wirksam. Deshalb wurde in meinen Versuchen DEAE-Dextran beige-fügt, dieses verbindet sich, wie JERNE (58) glaubte, mit denselben Stellen. So wird bereits einmalig zugesetztes Komplement wirksam.

Trotzdem wurde in späteren Versuchen zum Teil auf den Zusatz von DEAE-Dextran im Röhrchenansatz verzichtet, eben wegen der Untersuchungen darüber, daß die Ausbildung hämolytischer Höfe unter anderem abhängig von der Agarsorte ist (41). Mit Agarose ohne DEAE-Dextran wurde eine größere Empfindlichkeit beobachtet als mit der hier verwendeten Methode. Der Agarose sollen die antikomplementären Eigenschaften fehlen (6). Diese Aussage sollte aber hier nicht überprüft werden. Es sollte und konnte vielmehr ausgeschlossen werden, daß aufgrund einer unter Umständen schlechteren Empfindlichkeit des Difco-Agars plaquebildende Zellen unterdrückt wurden und so zu einem falsch negativen Ergebnis führten zu einem Zeitpunkt, bei dem es in vergleichbaren Untersuchungen (137) zu einem signifikanten zweiten Anstieg gekommen war: Die Kinetik der

PFC-Primärantwort von Mäusen nach oraler Immunisierung mit SRBC wies bei WERNER (137) einen biphasischen Verlauf mit einem zweiten Anstieg am 18. Tag nach der letzten Belastung auf. Eine Erklärung für das Auftreten einer offenbar neuen Zellpopulation fällt schwer, da ich einen zweiten Anstieg, noch dazu höher als der erste, nicht beobachten konnte. Es muß die individuelle Reaktionslage der Versuchstiere dabei eine Rolle gespielt haben.

Das Maximum der Primärantwort der PFC in der Milz wird nach einmaliger parenteraler Immunisierung bei den gebräuchlichsten Laboratoriumstieren, den Mäusen, am 4. Tag nach der Injektion erreicht (10,51,78,84,114,137). Demgegenüber reagieren hier wie bei BUSCHMANN (18,19) die Schweine verspätet. Es handelt sich dabei offenbar um eine Arteigenschaft der einzelnen Spezies; denn schon innerhalb der Nagetierfamilie, bei Ratten, sind spätere Gipfel der Primärantwort, gemessen am Auftreten immunkompetenter Zellen, zu verzeichnen gewesen (83,85).

Nach zehnmaliger oraler Antigengabe kommt es ähnlich wie bei SCHOLLENBERGER (112), aber unterschiedlich zu WERNERS Beobachtungen (137) früher als nach einmaliger parenteraler Gabe zum Auftauchen spezifischer antikörperbildender Zellen. Für den Immunapparat des Darmes wäre dies durchaus möglich: einmal, weil er der erste ist, der mit dem Antigen in Kontakt tritt, zum anderen kann nicht ausgeschlossen sein, daß durch die zehnmalige kontinuierliche Antigen-Verabreichung die Induktionsphase schon während der laufenden Immunisierung abgeschlossen war im Gegensatz zur einmaligen intraperitonealen Gabe. Hierfür sprechen auch die Beobachtungen, daß die anderen untersuchten Organe gleichzeitig früher, wenn auch nicht stärker reagierten. Die Feststellung, daß die "orale" Primärantwort niedriger als die "parenterale" ausfällt, ist immer wieder gemacht worden und auch hier zu sehen. Sie ist begründet in der erschwerten Möglichkeit, das Antigen in exakter Dosierung ohne Verlust an den Wirkort zu bringen.

Auffällig erscheint hier wie bei WERNER (137), und zwar offensichtlich unabhängig von der zugeführten Antigendosis, die unterschiedliche Dauer der Immunantwort in der Milz. Spezifische IgM-Globuline sind in der Milz nach intraperitonealer Belastung einige Tage länger nachweisbar als nach oraler. UHR (126) hat festgestellt, daß IgM-Globuline nur solange gebildet werden, wie das Antigen präsent ist; danach wird die humorale Immunität von den IgG-Globulinen übernommen. Dieser allgemein bekannte Wechsel der Immunkörperklassen im Verlauf der Immunantwort soll von demselben immunkompetenten Zellclon vorgenommen werden und ist als "switch over" bezeichnet worden (85,86,88). Bezogen auf meine Beobachtungen, hieße das jetzt, daß, gemessen am IgM-Vorkommen, das Fremdanigen nach oraler Gabe kürzere Zeit im Blutkreislauf zirkuliert als nach parenteraler, und zwar anscheinend dosisunabhängig (137). Im Verlauf der Immunantwort wird Fremdeiweiß zuerst von Zellen des RHS phagozytiert bzw., wie oben beschrieben, aggregiert. Nicht nur dieses unspezifische Abwehrsystem scheint in der Darmwand stark ausgebildet zu sein, es muß auch die Induktion von immunkompetenten Zellen schon lokal so ausgiebig stattfinden, daß nur relativ geringe Mengen von Antigen die Darmbarriere unverändert passieren. Diese Geschehnisse würden sich, wie hier gesehen, zum einen in einer nur kurzen Beteiligung von Milz und Lymphknoten an der IgM-Phase ausdrücken, zum anderen in der relativen Stärke der Antwort: Die Lamina propria antwortet, als erste vom Antigen betroffen, am stärksten dann, wenn es hier einen vergleichbar suffizienten Immunapparat wie in der Milz gibt. Dies ist hier am Schwein beobachtet worden. Da spezifische Serum-Antikörpertiter nach zweimaliger oraler Gabe niedriger lagen als nach einmaliger, folgte auch SCHOLLENBERGER (112), daß die Darmwand eine Barriere bildet. Die Beobachtungen BESREDKAS (7,8) werden damit fundiert. Auch CRABBE (28) hat festgestellt, daß nach oraler Gabe die intestinalen Plasmazellen am stärksten Antikörper produzieren. Neben der unter Umständen individuellen Reaktion des Versuchstieres

spielt einschränkend hinsichtlich der Quantität bei dieser Beobachtung wahrscheinlich auch die Art des Antigens eine Rolle. Erythrozyten fallen leicht der Proteolyse anheim, anders als durch ihre Kapsel geschützte Mikroorganismen oder gar für den Organismus indifferente Partikel und tauchen so von vornherein weniger im strömenden Blut auf als diese. In diesem Zusammenhang gesehen, besteht zwischen den Befunden hier und den Ergebnissen über die frühen Persorptionstiter (95,96,111,130,131) kein qualitativer Widerspruch; hier wie dort sind Partikel in die Blutbahn gelangt.

Eine weitere Eigenschaft der Erythrozyten besteht darin, vorwiegend die Bildung von IgM-Antikörpern zu induzieren (1,37,91,92). Als entsprechende Antigene wurden aus dem Erythrozytenstroma zwei Proteinfractionen isoliert, die die Hämolyse vom Gamma M-Typ hervorriefen (110). Es konnte deshalb bei der Verwendung von SRBC als Antigen an das Auftreten von spezifischen IgM-Antikörpern gedacht werden. Nun hat aber in den letzten Jahren das lokale Immunsystem der inneren Hohlorgane gerade dadurch Bedeutung gewonnen, daß hier ein besonderer Antikörpertyp als dominierend gefunden wurde: das IgA (23,24,28,46,52,56,68,79,93,104,107, 116,124,125,129), während IgM nicht oder nur in geringen Mengen vorkam. Deshalb scheint es auf den ersten Blick wenig sinnvoll, mit der Suche nach IgM-Globulinen überhaupt anzufangen. Trotzdem mußte auch im Darm die Bildung, zumindest aber ein passiver Transport von 19 S-Antikörpern in das Intestinum möglich sein; denn in den Fällen, in denen IgA fehlte, tauchte plötzlich IgM auf (14,52,124). Bemerkenswert ist weiter, daß das IgA meist speziell im Sekret des Darmes nachgewiesen wurde (24,52,93,129), so daß ein direkter Schluß auf den Globulingehalt im eigentlich interessanten Gebiet, dem immunkompetenten Gewebe, nicht gezogen werden konnte. Ferner ist es nicht zulässig, von der Quantität des Vorkommens allein auf die Bedeutsamkeit eines Antikörpers zu schließen; dies wird gerade an einem Ver-

gleich der Hämolysefähigkeit, die ja hier untersucht wird, der verschiedenen Antikörper deutlich: Ein Mol 19 S-Antikörper besitzt eine um mindestens 10^2 größere Hämolysepotenz als ein Mol 7 S-Antikörper (51,54,59). Eine weitere Beeinflussung des intestinalen Gammaglobulinspektrums kommt sicher durch die im Lumen vorhandenen Proteasen zustande. Wird ein Proteasenhemmer dem Darmsaft zugesetzt, erhöht sich die Zahl der nachweisbaren Antikörper beträchtlich (68,80), und gerade IgM ist ganz im Gegensatz zu IgA am ehesten durch Proteolyse zerstörbar (45).

Daß sich die Verhältnisse unter anderem eben wegen des anderen Milieus im Darmgewebe offensichtlich von denen im Lumen unterscheiden, zeigen meine Ergebnisse am Schwein ebenso wie die WERNERS (137) an der Maus. Die immunologische Kompetenz des Darmes wäre also nur unzureichend beschrieben, wenn man sich auf die Befunde aus seinem Sekret beschränken würde.

Nun ist es seit einiger Zeit unbestritten, daß das IgA, dessen dimere Form im Lumen dominiert, lokal synthetisiert wird. Entsprechende Zellen sind in Nasen- und Bronchialschleimhaut sowie in Dünn- und Dickdarm nachgewiesen worden, wobei die Autoren gleichzeitig IgM-produzierende Zellen nicht entdecken konnten (28,46,55,125). In Differenz dazu standen zu derselben Zeit die Ergebnisse CRANDALLs (29), der auf enterale Infektion in der frühen Antwort einen deutlichen Anstieg der Zellen im Dünndarm von Kaninchen verzeichnete, die schwere Ketten der μ -Globuline produzierten, im Gegensatz zu Befunden nichtinfizierter Tiere. Auch OZER (87) fand im Kaninchendarm Zellen, die IgM-Globuline bildeten. Über die immunologische Signifikanz (29) bzw. die Immunkompetenz (87) machten beide Autoren zurückhaltende Aussagen. PORTER (93) hat dann aus seinen analogen Ergebnissen die Ansicht vertreten, daß dem IgM eine "beträchtliche Signifikanz" in der lokalen Immunantwort des Darmes - hier bei Rindern - zukommt.

Im Jenunum fand er ca. 1/2 soviel IgM wie IgA-produzierende Zellen, im Ileum kehrte sich das Verhältnis sogar zugunsten des IgM um. Im Einklang mit neueren Befunden ALLENS (2), nach denen bei jungen Schweinen eine in allen Abschnitten des Dünndarms höhere Besiedlung der Mukosa mit IgM- als mit IgA-produzierenden Zellen nachzuweisen war, stellt meine Beobachtung des IgM-Anstiegs eine signifikante primäre Immunantwort des Darmes der mini-pigs auf enterale Belastung dar.

Vergleicht man die Eigenschaften von IgM und IgA, so haben die beiden Immunglobuline eine offenbar ähnliche bzw. ergänzende Rolle im Darm: IgM ist besonders fähig in der Abwehr Gram-negativer Organismen (64,76,89). IgA wiederum ist in einem Lumen zahlreich vorhanden, dessen natürliche Mikroflora ebenfalls Gram-negativer Art ist, so daß deshalb die Ansicht vertreten wurde, daß diese Mikroflora den antigenen Stimulus zur Bildung von IgA darstellt (27). IgM vermag besser als IgA eine Lysis in Gegenwart von Komplement auch bei Bakterien zu vollziehen (65,76). IgA induziert besser eine Phagozytose (65). Betrachtet man dazu die unterschiedliche Widerstandsfähigkeit gegen Proteolyse (45), so scheint eine Aufgabenteilung der beiden Antikörper im Sinne von HEREMANS (52) und TOMASI (123) gegeben: IgA stellt den äußeren Schutz dar, indem es die epithelialen Oberflächen abschirmt; IgM bildet dahinter die "zweite Verteidigungslinie" (2); es besteht ein doppelter Schutz. Die Aussage, daß IgM keinen wesentlichen Beitrag zu den Sekret-Koproantikörpern darstellt (68), bleibt unbestritten, ohne dabei mit den hier gemachten Aussagen in Widerspruch zu treten.

IgM scheint bis hin zu jeder Erstantwort auf ein Antigen phylogenetisch und ontogenetisch den frühesten Antikörper darzustellen (2,102,128). In diesem Zusammenhang interessant sind die Beobachtungen VAERMANS (128), der in der intestinalen Mukosa eines sechs Tage alten Tieres nur IgM-produzierende Zellen fand, während ein drei Wochen altes aus demselben Wurf auch zahlreiche IgA-produzierende Zellen

aufwies. Im Laufe der Entwicklung des Organismus differenzieren sich auch die Immunkörper zum Beispiel hinsichtlich der Anpassung an das Milieu, hier speziell das der äußeren Körperhöhlen, und es taucht IgA auf. Kommt es nun wie bei der IgA-Agammaglobulinämie nicht zu dessen Bildung, so ist der Körper in der Lage, dieses Fehlen durch IgM zu kompensieren, wie diesbezügliche Befunde von Menschen mit sonst klinisch gesundem Habitus zeigen (14,124).

Die Ergebnisse der einmaligen Immunisierung mit 20 ml SRBC intraperitoneal mit dem überragenden Auftreten von PFC in den Mesenteriallymphknoten bei einem Tier können nur so gedeutet werden, daß hier eine ungewollte parenterale Boosterreaktion stattgefunden haben muß. Das Tier, das am 7. Tag nach der SRBC-Injektion getötet wurde, muß vor seiner Absonderung zu den Versuchen Hammelfleischabfälle oder ähnliches bekommen haben. Dies würde eine orale Immunisierung dargestellt haben; die nochmalige Gabe desselben Antigens würde dann eine Hyperimmunantwort ausgelöst haben. Daß dies prinzipiell möglich ist, hat LEFÈVRE in Versuchen mit Rinderalbumin als Antigen nachgewiesen: Nach oraler Erstimmunisierung ergibt eine intraperitoneale Zweitbelastung eine typische Hyperimmunantwort (69). Die Versuchsgruppe hatte eigentlich den Zweck herauszufinden, ob die Erhöhung der Antigen-dosis auf das Doppelte auch zu einer höheren PFC-Zahl in den Organen führt, jedoch ist auch wegen des nicht typischen quantitativen Verteilungsmusters, in dem die Milz führend sein sollte, eine solche Schlußfolgerung nicht möglich. Daneben brachten die Ergebnisse des am 10. Tag nach Injektion untersuchten Tieres so unauffällige Backgroundwerte wie die des nur mit 10 ml belasteten entsprechenden Tieres. Da zudem mit der Gabe von 10 ml SRBC gute Resultate erzielt worden waren, wurde diese Dosierung beibehalten.

Die Frage nach der Eigenständigkeit der Koproantikörper kann nur mit einem Kompromiß beantwortet werden. Da das Antigen in den Körperkreislauf gelangt, induziert es dort eine allgemeine Immunantwort in der Form zirkulierender Antikörper. Die im Intestinum gefundenen "Koproantikörper" sind, wie auch etliche Autoren annehmen, zum Teil aus dem Serum diffundiert, zum Teil am Orte gebildet (44,45,68,112).

Die frühe Phase einer Primärantwort besteht grundsätzlich im Auftauchen von IgM; daß dies auch im Darm der Fall ist, zeigt, daß dort nicht nur ein besonderes Immunsystem, sondern auch ein vollständiges vorliegt. Seine besondere Rolle dürfte mit dem Material zusammenhängen, mit dem der Darm primär und unvermeidbar mit jeder Nahrungsaufnahme kontaminiert ist, dem heterologen Antigen, während Milz und Lymphknoten die Aufgabe der Eliminierung autologer Fremdstoffe zufallen würde, ehe sie nach Durchbruch der Darmbarriere deren Funktion zusätzlich übernehmen würden.

Die orale Immunisierung stellt nicht nur eine denkbar bequeme Anwendungsweise dar, sie ahmt auch eine häufige Antikörperherausforderung des Organismus treffend nach.

Zusammenfassung

Die Immunantwort Göttinger Zwergschweine auf Hammelerythrozyten wurde untersucht. Das Antigen wurde oral oder intraperitoneal verabreicht. Die Kinetik der Primärantwort wurde modifiziert mit der lokalen Hämolyse in Gel-Technik nach JERNE verfolgt; das Auftreten spezifischer Hämolsine produzierender Zellen wurde gemessen.

Nach intraperitonealer Impfung reagiert die Milz an führender Stelle. Der Gipfel dieser Primärantwort taucht gegenüber anderen Laboratoriumstieren mit dem 7. Tag nach der letzten Impfung verspätet auf. Nach zehnmaliger oraler Immunisierung kommt es früher als nach einmaliger intraperitonealer zu einer Vermehrung von immunkompetenten Zellen, die spezifische Hämolsine bilden. Hierbei antwortet der Dünndarm am stärksten gefolgt von Milz und Lymphknoten. Die primäre Immunantwort nach oraler Impfung hält nicht solange an wie die nach intraperitonealer.

Bei Zwergschweinen treten nach oraler wie nach intraperitonealer Impfung mit Hammelerythrozyten Immunozyten nicht nur in Milz und Lymphknoten, sondern auch in der Lamina propria des Dünndarms auf. Sie wurden mit der direkten JERNE-Technik nachgewiesen und produzieren also vorwiegend Hämolsine vom IgM-Typ.

Literaturangaben

- (1) ADINOLFI, M., M.J. POLLEY, D.A. HUNTER, P.L. MOLLISON: Classification of blood group antibodies as β_M or gamma globulin. Immunol 5, 566 (1972)
- (2) ALLEN, W.D., and D. PORTER: The relative distribution of IgM and IgA cells in intestinal mucosa and lymphoid tissues of the young unweaned pig and their significance in ontogenesis of secretory immunity. Immunol. 24, 493 (1973)
- (3) ARCHAMBEAU, J.O., R.G. FAIRCHILD, and S.L. COMMERFORD: Response of the skin of swine to increasing exposures of 250 KVP X-Ray, in: Swine in Biomedical Research, Proceedings of a Symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, July 19-22, 1965, S. 463
- (4) ATTARDI, G., M. COHN, K. HORIBATA, and E.S. LENNOX: Antibody formation by rabbit lymph node cells. II. Further observations on the behaviour of single antibody-producing cells with respect to their synthetic capacity. J. of Imm. 92, 346 (1964)
- (5) BAILEY, G.H.: Respiratory immunity in rabbits. III. The production of heterophile antibody in rabbits by intranasal infection with *Bacterium Lepisepticum*. The Amer. J. of Hyg. 8, 398 (1928)
- (6) BERNOVSKÁ, J., J. KOSTKA, J. STERZL: Haemolytic reaction in gels. Fol. microbiol. 8, 376 (1963)
- (7) BESREDKA, A.: Du mechanisme de l'infection Dysentérique, de la vaccination contre la dysentérie par la voie buccale et de la nature de l'immunité antidysentérique. Ann. de l'Inst. Past. 33, 301 (1919)
- (8) BESREDKA, A.: De la vaccination contre les Etats Typhoïdes par la voie buccale. Ann. de l'Inst. Past. 33, 882 (1919)
- (9) BIOZZI, G., R.A. BINAGHI, C. STIFFEL, and D. MOUTON: Production of different classes of immunoglobulins by individual cells in the Guinea pig. Immunol. 16, 349 (1969)

- (10) BIOZZI, G. C. STIFFEL, D. MOUTON, Y. BOUTHILLIER, C. DECREUSEFOND: A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. *Immunol.* 14, 7 (1968)
- (11) BLOCH, K.J., KOURILSKY, F.M., Z. OVARY, and B. BENACERRAF: Properties of Guinea pig 7 S-antibodies. III. Identification of antibodies involved in komplement fixation and hemolysis. *J. Exp. Med.* 117, 965 (1963)
- (12) BORGSTRÖM, B., A. DAHLQUIST, G. LUNDH, J. SJÖVALL: Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *J.clin. Invest.* 36, 1521 (1957)
- (13) BOSMAN, C., and J.D. FELDMAN: The proportion and structure of cells forming antibody, G and M immunoglobulins, and G and M antibodies. *Cell Immunol.* 1, 31 (1970)
- (14) BRANDTZAEG, P., I. FJELLANGER, S.T. GJERULDSSEN: Immunoglobulin M: Local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* 160, 789 (1968)
- (15) BUNTING, C.H., J. HUSTON: Fate of the lymphocyte. *J. Exp. Med.* 33, 593 (1921)
- (16) BURROWS, W., M.E. ELLIOT, and I. HAVENS: Studies on immunity to Asiatic cholera. IV. The excretion of Coproantibody in experimental enteric cholera in the Guinea pig. *J. of Infect. Dis.* 81, 261 (1947)
- (17) BURROWS, W., and I. HAVENS: Studies on immunity to Asiatic cholera. V. The absorption of immunoglobulin from the bowel and its excretion in the urine and feces of experimental animals and human volunteers. *J. of Infect. Dis.* 82, 231 (1948)
- (18) BUSCHMANN, H.: Über den Nachweis antikörperbildender Zellen mit Hilfe der Agar-Plaque-Technik beim Schwein. *Zbl. Vet. Med.* 16, 283 (1969)
- (19) BUSCHMANN, H., and H. SCHUMANN: A kinetic and genetic study of the cellular and humoral immune response in pigs after immunization with sheep erythrocytes. *Z. Immun.-Forsch.* 141, 211 (1971)

- (20) BUSSARD, A.E., and J.L BINET: Elektron Mikrography of antibody-producing cells. Nat. 205, 675 (1965)
- (21) BUSTAD, L.K., R.O. McCLELLAN: Swine in biomedical research. Proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, July 19-22, 1965 Printed in the United States of America by Frayn Printing Co., Seattle
- (22) CAMPBELL, P.A.: T-cells: The limiting cells in the initiation of immune responses in normal mouse spleens. Cell. Immunol. 5, 338(1972)
- (23) CEBRA, J.J., and J.B. ROBBINS: γ A-immunoglobulin from rabbit colostrum. J. of Imm. 97, 12 (1966)
- (24) COE, J.E.: Studies on IgA of the Guinea-pig. Immunol. 22, 333 (1972)
- (25) COLLINS, D.H., and W. GOLDIE: Observations on poly-arthritis and on experimental erysipelo-thrix infection of swine. J. Path. Bact. 50, 323 (1940)
- (26) COOPER, M.D., R.D.A. PETERSON, M.A. SOUTH, and R.A.GOOD: The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. J. Exp. Med. 123, 75 (1966)
- (27) CRABBÉ, P.A., H. BAZIN, H. EYSEN, and J.F. HEREMANS: The normal microbial flora as a major stimulus for the proliferation of plasma cells synthesising IgA in the gut. Int. Arch. Allerg. 34, 362 (1968)
- (28) CRABBÉ, P.A., D.R. NASH, H. BAZIN, H. EYSEN, and J.F. HEREMANS: Antibodies of the IgA-type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral or parenteral immunization with Ferritin. J. Exp. Med., 130, 723 (1969)
- (29) CRANDALL, R.B., J.J. CEBRA, and C.A. GRANDALL: The relative proportions of IgG-, IgA-, and IgM containing cells in rabbit tissues during experimental trichinosis. Immunol. 12, 147 (1967)
- (30) DAVIE, J.M., and W.E. PAUL: Receptors on immunocompetent cells. II. Specificity and nature of receptors on dinitrophenylated Guinea pig albumin¹²⁵I binding lymphocytes of normal Guinea pigs. J. Exp. Med. 134, 495 (1971)

- (31) DAVIE, J.M., and W.E. PAUL: Receptors on immunocompetent cells. IV. Direct measurement of avidity of cell receptors and cooperative binding of multivalent ligands. J. Exp. Med. 135, 643 (1972)
- (32) DAVIE, J.M., A.S. ROSENTHAL, and W.E. PAUL: Receptors on immunocompetent cells. III. Specificity and nature of receptors on dinitrophenylated guinea pig albumin¹²⁵I binding lymphocytes of immunized Guinea pigs. J. Exp. Med. 134, 517 (1971)
- (33) DIENER, E., N. KRAFT, and W.D. ARMSTRONG: Antigen recognition. I. Immunological significance of antigen-binding cells. Cell Immunol. 6, 80 (1973)
- (34) DUPONT, M.: Contribution à l'étude des antigenes des globules rouges. Arch. Internat. Med. Exp. 2, 133 (1934)
- (35) EAGLE, H.: Propagation in fluid medium of human epidermoid carcinoma strain KG. Proc. Soc. exp. Biol. 89, 362 (1955)
- (36) EHRLICH, P.: VI. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Über Ricin. Deut. Med. Wschr. 17, 976 (1891)
- (37) FAHEY, J.L.: Classes of blood-group antibodies. Ann. N.Y. Acad. Sci. 169, 164 (1970)
- (38) FELDMANN, M., and A. BASTEN: The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus derived cells in the immune response. J. Exp. Med. 134, 103 (1971)
- (39) FICHTELIUS, K.E.: The mammalian equivalent to bursa Fabricii of birds. Exp. Cell Res. 46, 231 (1967)
- (40) - The gut epithelium - a first level lymphoid organ? Exp. Cell Res. 49, 87 (1968)
- (41) FINGER, H. und P. EMMERLING: Agarqualität und Diäthylaminoäthyl-Dextran als kritische Komponenten der LHG-Technik. Zschr. Imm. Forsch. 136, 145 (1968)
- (42) FORSSMANN, J.: Die Herstellung hochwertiger spezifischer Schafhämolysine ohne Verwendung von Schafblut. Biochem. Zschr. 37, 78 (1911)

- (43) FRENCH, J.E., and M.A. JENNINGS: Comparative Atherosclerosis. ed. by J.C. Roberts, Jr., and R. Straus-Hoeber Med. Div., Harper and Row Publishers, N.Y. p 25 (1965)
- (44) FRETER, R.: Detection of coproantibody and its formation after parenteral and oral Immunization of human volunteers. J. Infect. Dis. 111, 37 (1962)
- (45) FUBARA, E.S., and R. FRETER: Availability of lokally synthesized and systemic antibodies in the intestine. Inf.and Imm. 6, 965 (1972)
- (46) GELZAYD, E.A., S.C. KRAFT, F.W. FITCH: Immunoglobulin A: Localization in rectal mucosal epithelial cells. Science 157, 930 (1967)
- (47) GEORGE, L.A., and L.K. BUSTAD: Comparative effects of beta irradiation of swine, sheep, and rabbit skin, in: Swine in biomedical research, Proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, ed. by Bustad, L.K., p 491 (1965)
- (48) GOOD, R.A., W.D. BIGGARS, and B.H. PARK: Immunodeficiency Diseases of man, in: Progress in immunology ed. by Amos, B., Acad. Press, New York and London, p. 699 (1971)
- (49) HALL, J.G., M.E. SMITH: Homing of lymphborne immunoblasts to the gut. Nat. 226, 262 (1970)
- (50) HARING, F., R. GRUHN, D. SCHMIDT und B. SCHEVEN: Die Züchtung eines Miniaturschweines als Laboratoriumstier. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 189, 521 (1963)
- (51) HEGE, J.S., and L.J. COLE: Antibody Plaqueforming cells: Kinetics of primary and secondary responses. J. of Imm. 96, 559 (1966)
- (52) HEREMANS, J.F.: Die biologische Bedeutung des exokrinen IgA-Immunglobulins, in: Behring-Werk-Mitteilungen, Heft 49, 28 (1969)
- (53) HUBER, W.G., and R.F. WALLING: Gastric secretion and ulcer formation in the pig, in: Swine in biomedical research. Proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, ed. by Bustad, L.K., p 121 (1965)

- (54) HUMPHREY, J.H., and R.R. DOURMASHKIN: Complement. Ciba foundation symposium, ed. by Wolstenholme, G.E.W. and J. Knight, Churchill, London (1965)
- (55) HUNTER, Jr, R.L.: Antigen trapping in the lamina propria and production of IgA antibody. Res (N.Y.) 11, 245 (1972)
- (56) HURLIMANN, J., and G. HUBER: In vitro protein synthesis by human salivary glands. I. Synthesis of salivary IgA and serum proteins. Immunol. 14, 809 (1968)
- (57) INGRAHAM, J.S.: Application of a localized hemolysin reaction for specific detection of individual antibody forming cells. J. Exp. Med. 119, 667 (1964)
- (58) JERNE, N.K., A.A. NORDIN, and C. HENRY: The Agar-Plaque-Technique for recognizing antibody producing cells, in: Cell bound antibodies, ed. by Amos, B., H. Koprowski, Wistar Inst. Press 109 (1963)
- (59) KABAT, E.A.: Einführung in die Immunchemie und Immunologie. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1971)
- (60) KAEMMERER, K.: Grundlagenuntersuchungen an Zwergschweinen. Zschr. Versuchstierk. 5, 157 (1964)
- (61) KANAMBIKA, P., and V. MUTHUKKARUPPAN: The immune response to sheep erythrocytes in the lizard calotes versicolor. J. of Imm. 109, 415 (1972)
- (62) KARNOWSKI, W.D., and UNANUE: An ultrastructural study of lymphocytes with surface bound immunoglobulin. J. Exp. Med. 135, 267 (1972)
- (63) KENWORTHY, R.: Effects of Escherichia coli on germfree and gnotobiotic pigs. I. Light and electron microscopy of the small intestine. J. comp. Path. 80, 53 (1970)
- (64) KLAUS, G.G.B., A. BENNETT, and E.W. JONES: A quantitative study of the transfer of colostral immunoglobulins to the newborn calf. Immunol. 6, 293 (1969)

- (65) KNOFF, J., J. BREU, P. WERNET, and D. ROWLEY: The relative antibacterial efficiency of IgM, IgG, and IgA from pig colostrum. Aust. J. Exp. Biol.Med.Sci. 49, 405 (1971)
- (66) KÖRNER, W., W. MAASSEN, und H.J. PETTENKOFER: Über die Entstehung der ABO-Isoantikörper beim Säugling. Zschr.Imm.Forsch. 123, 473(1962)
- (67) KOSHLAND, M.E., and W. BURROWS: Quantitative studies of the relationship between fecal and serum antibody. J. of Imm. 65, 93 (1950)
- (68) LEFÈVRE, H., H. PICHL, H.J. WERNER, A. WIENER und A. LISSY: Vergleichende Untersuchungen der Intestinalantikörper nach oraler oder intraperitonealer Immunisierung von Mäusen mit Hammelerythrozyten. Zbl. Bakt. I.Abt. Orig.A 217, 529 (1971)
- (69) LEFÈVRE, H., W. UECKER, P. BLÜMEL und H. RAETTIG: Untersuchungen zur oralen Immunisierung. Die sekundäre Immunreaktion nach primärer oraler und nachfolgender oraler bzw. parenteraler Applikation von bovinem Serumalbumin (BSA) beim Kaninchen. Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 213, 548 (1970)
- (70) LEVANON, Y., H. RAETTIG, and S.M. ROSSETINI: Positive immunological reaction of gut cells from orally immunized animals demonstrated by Passive Cutaneous Anaphylaxis. Exp. 24, 600 (1968)
- (71) LOEFFLER, F.: Über die Immunisierung per os. v. Leuthold Gedenkschrift, Berlin (Verlag Hirschwald) 1, 247 (1906)
- (72) LONG, C.H.: Factors which influence gastrointestinal absorption in the immediate postnatal period. Ph.D.Thesis, Michigan State University, East Lansing (1964)
- (73) LUGINBÜHL, H.: Spontaneous atherosclerosis in swine, in: Swine in biomedical research, Proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, p 347 (1965) ed. by Bustad, L.K.
- (74) MARCHALONIS, J.J., R.E. CONE, and J.L. ATWELL: Isolation and partial characterisation of lymphocyte surface immunoglobulins. J. Exp. Med. 135, 956 (1972)

- (75) MELLORS, R.C., and L. KORNGOLD: The cellular origin of human immunoglobulins. J. Exp. Med. 118, 387 (1963)
- (76) MICHAEL, J.G., and F.S. ROSEN: Association of natural antibodies to Gram-negative bacteria with the γ M macroglobulins. J. Exp. Med. 118, 619 (1963)
- (77) MOCHMANN, H., H.W. OCKLITZ, E.F. SCHMIDT, L. HERING und J. MILLECK: Laboratoriumsversuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem Na-Desoxychelate-Extrakt aus *Dyspepsie coli* Stämmen. III. Die Schutzwirkung des Extraktes im aktiven Mäuseschutzversuch. Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 203, 314 (1967)
- (78) MÖLLER, G.: 19 S antibody production against soluble polysaccharide antigens by individual lymphoid cells in vitro. Nat. 207, 1166 (1965)
- (79) MOREIN, B.: Immunity against parainfluenza-3 virus in cattle; immunoglobulins in serum and nasal secretions after subcutaneous and nasal vaccination. Z.Imm.Forsch. 144, 63 (1972)
- (80) MÜLLER-RUCHHOLTZ, W., J. FÜLLHAAS, und H.G. SONNTAG: Untersuchungen über Intestinalantikörper. II. Vorkommen und Schutzfunktion intestinaler Antikörper nach Hemmung antagonistischer Darmsaft-Wirkungen. Z. Imm. Forsch. 140, 105 (1970)
- (81) NEHER, G.M., and J.M. CARTER: Experimental rheumatoid-like arthritis in swine, in: Swine in biomedical research. Proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, ed. by Bustad, L.K., p 235 (1965)
- (82) NORDIN, A.A., H. COSENZA, St. SELL: Immunoglobulin classes of antibody-forming cells in mice. II. Class restriction of plaque-forming cells demonstrated by replica plating. J. of Imm. 104, 495 (1970)
- (83) NOSSAL, G.J.V., C.M. AUSTIN, G.L. ADA: Antigens in immunity. VII. Analysis for immunological memory. Immunol. 9, 333 (1965)

- (84) NOSSAL, G.J.V., H. LEWIS, and N.L. WARNER: Differential sensitivity of hemolytic plaque methods at various stages of the immune response. *Cell. Imm.* 2, 13 (1971)
- (85) NOSSAL, G.J.V., A. SZENBERG, G.L. ADA, and C.M. AUSTIN: Single Cell Studies on 19 S. antibody production. *J. Exp. Med.* 119, 485 (1964)
- (86) NOSSAL, G.J.V., N.L. WARNER, and H. LEWIS: Incidence of cells simultaneously secreting IgM and IgG antibody to sheep erythrocytes. *Cell. Imm.* 2, 41 (1971)
- (87) OZER, H., and B.H. WAKSMAN: Appendix and M antibody formation. IV. Synergism of appendix and bone marrow cells in early antibody response to sheep erythrocytes. *J. of Imm.* 105, 791 (1970)
- (88) PAPERMASTER, B.W.: The clonal differentiation of antibody producing cells. *Cold Spr. Harb. Sym. quant. Biol.* 32, 447 (1967)
- (89) PENHALE, W.J.: Gamma globulin levels and neonatal mortality in market calves. *Vet. Rec.* 77, 322 (1965)
- (90) PERRY, T.W., R.A. PICKETT, T.M. CURTIN, W.M. BEESON, and A.J. NUWER: Studies on esophagogastric ulcers in swine, in: *Swine in biomedical research, proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington*, ed. by Bustand, L.K., p 129 (1965)
- (91) PETTENKOFER, H.J., W. MASSEN, R. BIAKERICH: Antigen-gemeinschaft zwischen menschlichen Blutgruppen und Enterobacteriaceen. *Z. Imm. Forsch.* 119, 415 (1960)
- (92) POLLEY, M.J., M. ADINOLFI, P.L. MOLLISON: Serological characteristics of anti A related to type of antibody protein (7 S or 19 S) *Vox Sang.* 8, 385 (1963)
- (93) PORTER, P., D.E. NOAKES, and W.D. ALLEN: Intestinal secretion of immunoglobulins in the preruminant calf. *Immunol.* 23, 299 (1972)
- (94) POWELL, H.M.: Immunization with hetrophile antigen when given by mouth. *The Amer. J. of Hyg.* 5, 228 (1925)

- (95) RAETTIG, H.: Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für virus.
Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 191, 97 (1963)
- (96) - Tierexperimente zur Resorptionsvirämie.
Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 192, 534 (1964)
- (97) - Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. I. Mitt. Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen Enteritis-Infektion.
Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 193, 398 (1964)
- (98) - Die Zahl der Kontaktinfektionen nach Typhus- und Paratyphus-Explosionsepidemien als Maßstab für die Wirksamkeit von oralen Impfungen.
Bundesges.bl. 11, 370 (1968)
- (99) - Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen. Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert Koch-Institut.
Bundesges.Bl. 14, 141 (1971)
- (100) - Probleme der Typhusschluckimpfung. Experimentelle Untersuchungen und klinisch epidemiologische Erfahrungen.
Münch. Med. Wschr. 110, 2220 (1968)
- (101) RAETTIG, H., G. LAUDAHN und M. MÜLLING: Immunprophylaxe der Kälbersalmonellose durch orale Impfung mit inaktivierten Bakterien.
Fortschr. Vet. Med. 17, 176 (1972)
- (102) RAFF, M.C.: T and B lymphocytes and immune response.
Nat. 242, 19 (1973)
- (103) RAUSS, K., and I. KÉTYI: Serum- and koproantibodies in mice, immunized perorally with Shigella Flexneri. Zschr.Imm.Forsch.127, 37 (1964)
- (104) REYNOLDS, H.Y., J.S. JOHNSON: Canine immunoglobulins. III. Distribution of immunoglobulins in colostrum and isolation of secretory IgA and 7 S₁. J. of Imm. 104, 1000 (1970)
- (105) RIEDER, L.: Über die aktive Antikörper-Bildung beim Schwein. Tierärztl.Umsch. 23, 267 (1968)
- (106) ROELANTS, G.E.: Quantification of antigen specific T and B lymphocytes in mouse spleens.
Nat. New Biol. 236, 252 (1972)

- (107) ROSSEN, R.D., S.M. WOLFF, and W.T. BUTLER: The antibody response in nasal washings and serum to *S.typhosa* endotoxin administered intravenously. *J. of Imm.* 99, 246 (1967)
- (108) ROSSETINI, S.M.O., Y. LEVANON, H. RAETTIG, B. UECKER: Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. VI. Mitt. Nachweis von Reaginen im Serum und in Dünndarmzellen oral geimpfter Laboratoriumstiere. *Zbl. Bakt. I.Abt. Orig.* 208, 16 (1968)
- (109) ROWLEY, D.A., and F.W. FITCH: Homeostasis of antibody formation in the adult rat. *J. Exp. Med.* 120, 987 (1964)
- (110) SANTOS-BUCH, C.A., and J.R. GUZMÁN-RIVERO: Isolation of a protein antigen following extraction of lipids from sheep red blood cell stroma. I. Hemolytic IgM primary response and hemolytic IgG secondary response in rabbits. *J. of Imm.* 100, 475 (1968)
- (111) SCHLEWINSKI, E., N. GRABEN, F. FUNK, E. SAHM, H. RAETTIG: Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. XIII. Mitt. Persorption und Sekretion von Mikroorganismen im Tierversuch. *Zbl. Bakt. I.Abt. Orig.* 218, 93 (1971)
- (112) SCHOLLENBERGER, A.: Ogólna i mieszcowa odpowiedź immunologiczna prosiąt po podaniu antygeny bakteryjnego drogą pozajelitową i alimentarną. I. Rodzaje przeciwciał w zależności od drogi podania antygeny. *Polsk. Arch. Wet.* 14, 2 (1971)
- (113) SCHREIBER, K.A.: Ein Feldversuch zur oralen Impfung mit inaktivierten Dyspepsie-Colibakterien im Säuglings- und Kleinkindesalter. *Inaug.Diss., Berlin* 1968
- (114) SERCARZ, E.E., and V.S. BYERS: The X-Y-Z-Scheme of immunocyte maturation. III. Early IgM memory and the nature of the memory cell. *J. of Imm.* 98, 836 (1967)
- (115) SIKES, D., G.M. NEHER, and L.P. DOYLE: The pathology of chronic arthritis following natural and experimental Erysipelothrix infection of swine. *Amer. J. Path.* 32, 1241 (1956)

- (116) SMITH, C.B., J.A. BELLANTI, and R. CHANOCK: Immuno-globulins in serum and nasal secretions following infection with type 1 parainfluenza virus and injection of inactivated vaccines. *J. of Imm.* 99, 133 (1967)
- (117) SOLOMON, J.B.: Ontogeny of cells producing hemolytic antibody or immunocyto-adherence to sheep erythrocytes in the chicken. *Immunol.* 14, 611 (1968)
- (118) SOLOMON, J.B., J. LEIPER, and T.M.S. REID: Ontogeny of hemolytic plaque-forming cells in the hamster; the response to sheep and mouse erythrocytes. *Immunol.* 22, 63 (1972)
- (119) SPRINGER, G.F., R.E. HORTON, M. FORBES: Origin of anti-human bloodgroup B agglutinins in White Leghorn chicks. *J.Exp.Med.* 110, 221 (1959)
- (120) STEFFEN, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie. G.Thieme Verlag, Stuttgart (1968)
- (121) STELLMACHER, W., W. MÜLLER: Die Schluckimpfung in der Veterinärmedizin. *Mh.Vet.Med.* 20, 370 (1965)
- (122) THONARD, J.C., and M.H. DALBOW: Local cellular antibodies. I. Plaque formation by sensitized oral mucosal cells from conventional animals. *J. of Imm.* 95, 209 (1965)
- (123) TOMASI, T.B.: The gamma A globulins in first line of defence. *Hosp. Pract.* 2, 26 (1967)
- (124) TOMASI, T.B., E.M. TAN, A. SOLOMON, and R.A. PRENDERGAST: Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J. Exp. Med.* 121, 101 (1964)
- (125) TOURVILLE, D.R., and T.B. TOMASI jr.: Selective transport of γ A. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 132, 473 (1969)
- (126) UHR, J.W.: The heterogeneity of the immune response. *Science*, 145, 457 (1964)
- (127) UHLENHUTH, Dr.: Neuer Beitrag zum spezifischen Nachweis von Eiereiweiß auf biologischem Wege. *Deut. Med. Wschr.* 26, 734 (1900)

- (128) VAERMAN, J.P., and J.F. HEREMANS: Distribution of various immunoglobulin containing cells in canine lymphoid tissue. Immunol 17, 627 (1969)
- (129) - The IgA system of the guinea pig. J. of Imm. 108, 637 (1972)
- (130) VOLKHEIMER, G., H. HERMANN, E. HERMANN, H. JOHN, F. AL ABESIE, S. WACHTEL: Über die Resorption und Ausscheidung von intakten Hefezellen. Zbl. Bakt. I.Abt. Orig. 192, 121 (1964)
- (131) VOLKHEIMER, G., F. SZARVAS, F. AL ABESIE, H. JOHN, S. WACHTEL: Aufsaugung von Polyvenylchlorid-Pulver durch die Dünndarmschleimhaut und deren Abtransport durch die Chylusgefäße. Deut. Ges. Wesen 16, 1727 (1961)
- (132) VOLKHEIMER, G., H. WENDLANDT, W. WAGEMANN, P. REITZIG, D. SCHNEIDER, C. BÖHM, M. BÖHM, B. ERAS, H. GRÖNING, G. HAUPTMANN, R. HILLER, H. LORENZ, A. MANDELKOW und S. STRAUCH: Beobachtungen zum Persorptionsmechanismus. Path. Mikrobiol. 31, 51 (1968)
- (133) M. WALZER: Studies in absorption of indigest protein in human beings. I. A simple direct method of studying absorption of undigested protein. J. of Imm. 14, 143 (1927)
- (134) WASSERMANN, A., J. CITRON: Über die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper. Ein Beitrag zur Frage der lokalen Immunität der Gewebe. Zschr. Hyg. Inf. 50, 331 (1905)
- (135) WEBSTER, L.T.: Experiments on normal and immune mice with a bacillus of mouse typhoid. J. Exp. Med. 36, 71 (1922)
- (136) WEINSTEIN, G.D.: Comparison of turnover number time and of keratinous protein fractions in swine and human epidermis, in: Swine in biomedical research, proceedings of a symposium at the Pacific Northwest Laboratory, Richland, Washington, ed. by L.K. Bustad, p 287 (1965)
- (137) WERNER, H.J.: Nachweis immunkompetenter Zellen in Darm und lymphatischen Organen der Maus nach oraler Immunisierung. Inaug. Diss., Berlin (1971)

- (138) WERNET, P., H. BREU, j. KNOP, and D. ROWLEY: Antibacterial action of spezific IgA and transport of IgM, IgA, and IgG from serum into the small intestine.
J. Inf. Dis. 124, 223 (1971)
- (139) WIENER, A.S.: Origin of naturally occurring hemagglutinins and hemolysins: A review.
Ja. of Imm. 66, 287 (1951)
- (140) WILSON, J.D., and M. FELDMANN: Dynamic aspects of antigen binding to B cells in immune induction.
Nat. New Biol. 237 (1972)

Mein Dank gehört Herrn Professor Dr. H. Raettig für die freundliche Überlassung des Themas sowie die ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Weiter bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. M. Mülling für die organisatorische Unterstützung bei den Tierversuchen und bei Herrn Dr. H. Weizenhöfer sowie Herrn Dr. H. Werner für die Anleitung zu den immunologischen Arbeiten.

Lebenslauf

Am 12. August 1947 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Günter Abel und dessen Ehefrau Ursula geb. Herr in Berlin-Wannsee geboren.

In Berlin habe ich von 1954 bis 1960 die Grundschule besucht und ging anschließend auf das Gymnasium Schadow-Schule in Berlin-Zehlendorf. Hier habe ich im Frühjahr 1967 mein Abitur bestanden.

Anschließend habe ich an der Freien Universität Berlin Humanmedizin studiert. Im Februar 1973 schloß ich das Studium mit dem Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistent bin ich in Kliniken in Berlin und Waldshut/Hochrhein tätig gewesen.

Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent im Klinikum Steglitz der Freien Universität.

